Roche Applied Science
BIOCHEMICA
Roche
2002 NUMBER 2(No.87)

インター ネット
Find Out What's new!

RTS(Rapid Translation System)コーナー

画期的なタンパク質発現システムであるRTS(Rapid Translation System)は、進化を続けます。

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
バイオケミカルニュース

目　次

NEW プロテオマスター－マイクログラムからミリグラムのタンパク質発現をサポートするRTS機器

ラピッドトランスレーションシステム(RTS)は、セルフリータンパク質製造のためにデザインされた、*in vitro* タンパク質発現システムです。DNAテンプレートから開始して、RTSタンパク質発現は24時間で、数マイクログラムから数十ミリグラムのレンジで得られます。このシステムの核は増強された*E. coli*ライセートと連続交換セルフリー(CECF)テクノロジーで、ml当たり5 mgのタンパク質発現を保証します。反応のサイズは50 µl(RTS 100)、1 ml(RTS 500)ですが、それに新しく10-30 ml(RTS 9000)が加わりました。RTS 500フォーマットをサポートするRTS 500インスツルメントに加え、今回、全てのフォーマット(RTS 100,500, 9000)に適合する、RTSプロテオマスターを新発売します。

セルフリータンパク質発現

RTSは迅速で簡便なタンパク質発現として開発されました。タンパク質の製造法から細胞を除外することにより、特別な施設を必要とせず、ハイスループットと簡便な操作を可能にします。セルフリー法の重要な欠点はその収量の低さでしたが、高度に生産的な*E. coli*ライセートの開発とCECFテクノロジーの組み合わせが、この欠点を克服し、ml当たり5 mgのタンパク質を製造しました。短時間で最適の結果を得ることが可能で、実験によりタンパク質製造のスケールアップが保証され、3種類のスケールが入手可能です。全ての反応スケールは、同一の*E. coli*ライセートを使用しています。

RTS 100:迅速なスクリーニングと至適化

RTS 100反応において、対象の遺伝子を含む直鎖状あるいは環状テンプレートが、50 µlの反応液中で転写・翻訳されます。2-4時間で20 µgが作成され、これは、合成時にRI標識の必要の無い、次の実験を行うのに十分な量です。RTS 100はCECFテクノロジーに基づいていませんが、他のRTS試薬と同じく、増強された*E. coli*ライゼートを使用しています。簡便なセットアップと小スケールにより、RTS 100は最初のタンパク質発現スクリーニングに適します。反応の最適化は、テンプレートや反応条件を選ぶことで、容易に達成されます。RTS 100はストリップとチューブを使用した24回反応と、マイクロプレートを使用した96回反応のサイズが入手可能です。

RTS 500:24時間にミリグラムオーダーのタンパク質を獲得

RTS 500プラットフォームは、1 mlの反応槽と10 mlのフィーディング槽を備えた特殊なチャンバーを利用しています。チャンバーは透析膜により仕切られています。CECFプロセスは、24時間の反応で、1mlの反応槽当たり5 mgまでのタンパク質を製造します。RTS 100のフォーマットで、その互換性をチェックされた環状テンプレートが使用されます。

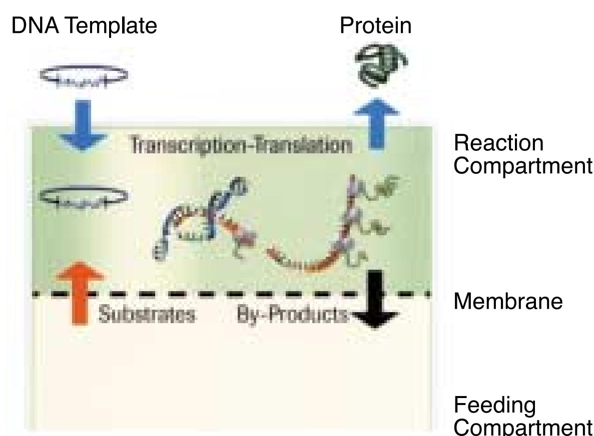


図1. CECFとHYテクノロジーを使用したタンパク質発現のスキーム。
ディスポーザブルのRTS 500と9000の反応デバイスは3つのコンポーネントよりなる:反応槽、半透膜、フィーディング槽である。RTS試薬を再懸濁し、適切な槽に充填した後、トランスクリプションとトランスレーションは反応槽で同時に起こる。基質とエネルギー成分は半透膜を介して反応槽に連続的に供給される。反応阻害性の副次産物は同じ膜を介して、フィーディング槽へと拡散する。

インター ネット
Find Out What's new!

RTS 9000：分取サイズの大スケール発現

更なるタンパク質が必要とされるアプリケーションには、RTS 9000が反応のスケールアップにおける簡単な方法を提供します。10 mlと30 ml（3 x 10 ml）の反応槽を持つ新しいデバイスは50 mg（10 ml包装）および150 mg（30 ml包装）までのタンパク質の発現をサポートします。タンパク質発現が困難な場合にも、アプリケーションに十分な量のタンパク質を得るために有用です。

3種類のフォーマットを、1台のプロテオマスターで

発現の効率は、反応に用いたインキュベーション条件に依存します。RTSプロテオマスターインスツルメント（図2）は、RTS 100, 500, 9000チューブとデバイスの反応条件をデジタル制御します。加熱と冷却は、反応チャンバー中への空気の移送により達成されます。反応槽にフィットする数種類のインサートが入手可能で、様々なRTSデバイスを保持することができます。RTS 9000のチャンバーはアダプター無しで装着します。



図2．RTSプロテオマスター。
a）温度制御用のペルチェ素子を持つフタ。b）反応チェンバー。 c）コントロールパネル。 d）反応チャンバーにフィットする、RTS 100チューブ、RTS 500用デバイス、ミクロプレート用のアダプター。

RTS 500インスツルメントに比較し、RTSプロテオマスターはより多目的で、ハイスループットを提供します。RTS 500インスツルメントが1回の実行において、1本のRTS 500反応をサポートしているだけですが、RTSプロテオマスターは8本までのRTS 500反応を同時に進行させます。RTSプロテオマスターはまた、RTS 100とRTS 9000反応をサポートし、また0.5 mlや1.5 mlチューブでの反応も行うことができます。

温度制御（20-50℃）に加え、プロテオマスターは反応成分を混合し、CECF過程をサポートする攪拌機能を持っています。インスツルメントには、反応チューブのフタのところで反応成分が凝集することによる人工産物を最小限にするために、トップヒーティングも着いています。RTSプロテオマスターは全てのRTS反応において、信頼できる再現性のある結果を保証します。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
RTS 100 *E. coli* HYキット	3 186 148	1キット（24回反応）	\ 58,000
	3 186 156	1キット（96回反応）	\158,000
RTS 500 *E. coli* HYキット	3 246 817	1キット（2回反応）	\ 68,000
	3 246 949	1キット（5回反応）	\158,000
RTS 9000 *E. coli* HYキット	3 290 395	1キット（10 ml反応）	\300,000
	3 290 468	1キット（30 ml反応）	ご照会
RTSプロテオマスター	3 265 650	1台	ご照会

RTS 9000 *E. coli* HYキットー数十ミリグラムのタンパク質の迅速製造用システム



図1：キット内容

製品の記述

RTS 9000には、2種類の反応デバイスがあります。RTS 9000 *E. coli* HYキット（図1）中のデバイスは、1個の10 mlの反応槽と100 mlのフィーディング槽よりなります（図2）。このキットはRTS 500の10倍のスケールアップが可能です。キットの第2のバージョンは、3個の別れた10 ml反応槽を持ち、1から3種類のタンパク質が別々に発現できます（総タンパク質収量は約150 mg）。RTS 500 *E. coli* HYキットと同様、T7ポリメラーゼの触媒するトランスクリプションと*E. coli*ライセートによるトランスレーションが反応槽で同時に起こります（図2）。基質とエネルギー成分は半透膜（カットオフ値 10 kD）を介して反応槽に連続的に供給されます。反応阻害性の副次産物は同じ膜を介して、フィーディング槽へと拡散します（図2）。

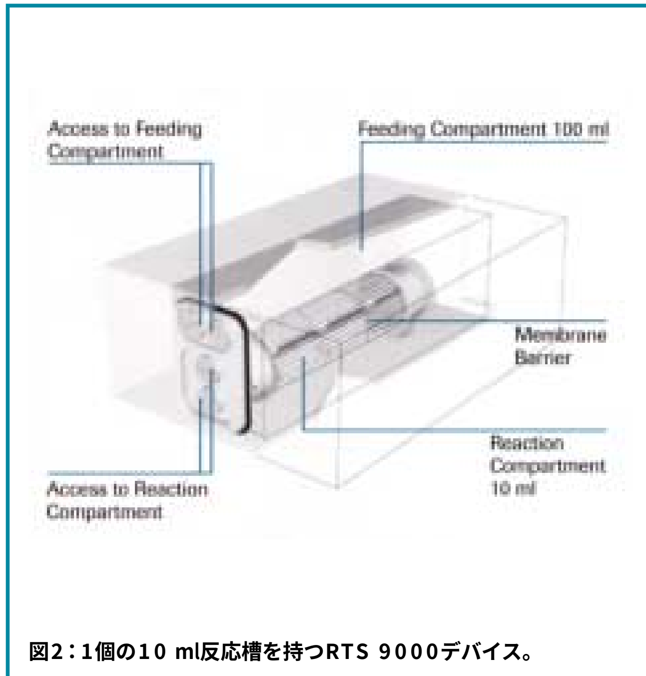


図2：1個の10 ml反応槽を持つRTS 9000デバイス。

製品のアプリケーション

一般的なタンパク質の発現

新しいタンパク質の場合はスケールアップの前に、RTS 100 HY *E. coli*キットやRTS 500 HY *E. coli*キットによる、適切な発現クローンの選択と発現条件の至適化が、強く推奨されます。RTS 9000 *E. coli* HYキットを使用して、タンパク質発現レベルが低いとしても、機能試験のための抗原の製造などの多くのアプリケーションには十分な量が作成されます。図3は、RTS 500とRTS 9000の反応ライセートのml当たりの、同様のタンパク質の製造を示し、スケールアップが容易に実行できることを示唆しています。多くの、様々なタイプのタンパク質が、既にRTS *E. coli*キットで成功しています（表1）。最新の発現タンパク質のリストは、www.proteinexpression.comを訪問してください。

表1：RTS 9000で発現したタンパク質のリスト

タンパク質	由来	プラスミドベクター	コメント
クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）	バクテリア	pIVEX1.1	
β-ガラクトシダーゼ	*E. coli*	pIVEX2.4	
ローダネーゼ	ウシ	pIVEX2.4	
グリーンフルオレッセントタンパク質（GFP）	*Aequorea victoria*	pIVEX2.1	
リコンビナント プラスミノーゲンアクチベータ	ヒト	pIVEX2.4	
GFP-[セルコピン P1]2	ブタ	pIVEX2.1	GFPに融合したダイマーのセルコピン P1
ペニシリンＧアミダーゼ（PGA）	*E. coli*	pIVEX2.1	
ルシフェラーゼ	*Photinus pyralis*	pIVEX2.4	
MBP-ヒトエリスロポエチン（MBP-EPO）		pIVEX2.4	マルトースバインディングプロテイン（MBP）と融合したEPO

構造生物学

RTS 9000 *E. coli* HYキットは、NMRスペクトロメトリーやX-線結晶学への標識タンパク質の大スケール製造に適しています。キットは、天然のアミノ酸を望みの非天然アミノ酸ミックスに簡単に交換できるようにデザインされています。メチオニンは容易にスレオメチオニンと置き換えられ、また独自のアミノ酸ミックスも選択できます。

方法：RTS 9000 *E. coli* HYキットを使用して

試薬を説明書通りに再懸濁した。165μgの様々な遺伝子をコードしたpIVEX発現ベクターを10.9 mlの懸濁反応ミックスに加えた。プラスミドを含む反応ミックス（10.92 ml）をRTS 9000デバイスの、中央の反応チャンバーに充填した。フィーディングチャンバーに110 mlの懸濁フィーディングミックスを充填した。反応槽とフィーディング槽を添付のスクリューで注意深く閉鎖した。このデバイスをRTSプロテオマスター内に装着した。温度コントロールは30℃、振とうスピードは900 rpmにセットした。全ての発現実験は、20時間行った。次に反応ミックスをキット添付のピペットでチャンバーから吸い出した。RTS 9000 *E. coli* HYキットとの比較のため、同じタンパク質をRTS 500 *E. coli* HYキットで、平行して発現した。RTS 500インスツルメントの攪拌スピードは120 rpmにセットし、温度コントロールは30℃とした。

均一な100μのサンプルを各反応ミックスから取り、900μlの再蒸留水で希釈した。攪拌後、20μlを取り10μlの再蒸留水と30μlのSDSサンプルバッファーで希釈した（3倍）。サンプルを95℃で5分間、熱した後、5μlをSDSゲルにロードし、電気泳動した。ゲルはクーマシーブルーで染色した（図3）。

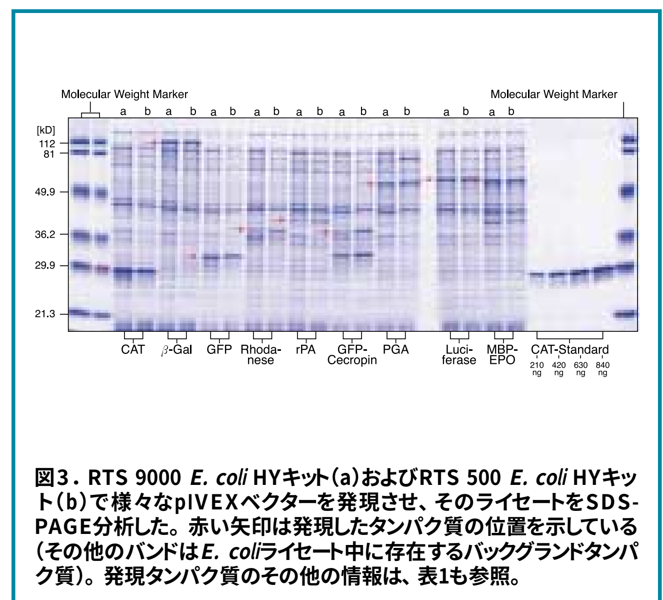


図3．RTS 9000 *E. coli* HYキット（a）およびRTS 500 *E. coli* HYキット（b）で様々なpIVEXベクターを発現させ、そのライセートをSDS-PAGE分析した。赤い矢印は発現したタンパク質の位置を示している（その他のバンドは*E. coli*ライセート中に存在するバックグランドタンパク質）。発現タンパク質のその他の情報は、表1も参照。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
RTSプロテオマスター	3 265 650	1台	ご照会
RTS 9000 *E. coli* HYキット	3 290 395	1キット（10 ml反応）	¥300,000
	3 290 468	1キット（30 ml反応）	ご照会

インター ネット

Find Out What's new!

第2世代pIVEXベクター ーセルフリータンパク質発現への至適化

RTSラピッドトランスレーションシステムの導入以来、RTS pIVEXベクターはHis_6タグを介しての、その検出や精製の容易さから、セルフリータンパク質の発現に広く使用されるようになりました。最初にキットに添付されたベクターはRTS 100, 500, 9000キットに対応するために単品試薬として発売されました。最近、第2世代のHis-タグベクターが、マルチプルクローニングサイトの複雑さを減少させて、2種類のプラスミドとして開発されました。

His-タギングは大変一般的な方法ですが、ウェスタンブロッティングで使用される抗体の特異性が限られ、しばしば不満足な結果をもたらします。また、このタグ配列は完全にアクセスできないため、いくつかのケースで検出に失敗したことも報告されています。ヘマグルチニン(HA)タグは、高度に特異的な検出シグナルや捕捉技術が必要な時に、重要な代替物です。これは新しいpIVEX HAタグベクターセットを使用して、RTS-発現タンパク質のN-あるいはC-末端に付加することができます。Anti-HAアフィニティマトリックスは、発現後のタンパク質の固相化(相互作用研究など)や小スケール精製に大変簡便な方法です。

RTSはオープンシステムですので反応条件を容易に適合できますが、いくつかのタンパク質は発現後いまだに凝集する傾向があり、標準的な至適化法に抵抗します。これらの問題を解決する約束されたアプローチは、対象のタンパク質のC-末端にマルトースバインディングタンパク質(MBP)を融合することで、しばしば可溶性と収量が増強されます。これらの融合は、pIVEX MBPフュージョンベクターへの、相当するcDNAのクローニングにより達成されます。

ここに記述した全てのタイプのN-末端タグと融合のパートナーは、ファクターXaレストリクションプロテアーゼの消化により、切断できます。POD標識抗体は、His_6とHAタグタンパク質に対して入手可能です(表1)。

表1:RTSシステムで入手可能なpIVEXベクターの概要

製品	タグあるいは融合物のタイプ	主なアプリケーション	検出	精製/固相化
RTS pIVEX His Tag 2nd 世代ベクターセット (Cat. No.3 269 019) 2ベクター \25,000	N-あるいはC-末端のHis_6タグ	大スケールの精製	POD標識抗His_6抗体 (Cat. No.1 965 085)	Ni-NTA
RTS pIVEX HA Tagベクターセット (Cat. No.3 268 993) 2ベクター \25,000	N-あるいはC-末端のHAタグ	高度に特異的で高感度な検出と固相化	POD標識抗HA抗体	Anti-HAアフィニティマトリックス
RTS pIVEX-MBPフュージョンベクター (Cat. No.3 268 985) 2ベクター ¥18,000	N-あるいはC-末端のHis_6タグ、MBP融合 (40.5 kDa)	不溶性で低収量のタンパク質の発現。利点:2種類の精製原理を組合わせることが可能(His_6およびMBP)。	POD標識抗His_6抗体 (Cat. No.1 965 085)	アミロースカラム(NEB)やNi-NTA

DIG コーナー

<結核菌(*M.tuberculosis*)のRFLP解析の標準化と省力化-検査室におけるDIGシステム>

はじめに

結核菌の疫学マーカーとして以前は, 薬剤感受性パターンやファージ型別が用いられていましたが, より特異性の高いIS6110をプローブとしたRFLPの有用性が90年代に数多く報告され, 日本においても結核研究所にて広く研究され, 現在では最も有効な方法として利用されています. 当所においても、安全実験室の整備を機会に、三重県内で発生した集団感染の疑いのある事例についてRFLPを実施することとなりました。しかし、本法の手技は決して簡便とは言えず、他の業務に支障が出ないよう極力省力化するため、DIGシステムを採用して試薬調製の手間を省いています。

材料と方法

1)DIG標識DNAプローブの作成

PCR DIGプローブ合成キットの取扱説明書に従い、以下の操作手順で標識プローブを作成した。テンプレートDNAの調製には、市販DNA抽出キットを用いた。

反応溶液の調製:

試薬	容量
滅菌再蒸留水	30.25 μl
10x PCRバッファー(バイアル3)	5 μl
PCR DIGラベリングミックス(バイアル2)	5 μl
プライマーISN-1, ISN-2(50 μM)	各2 μl
Expand HF酵素ミックス(バイアル1)	0.75 μl
テンプレートDNA	5 μl
トータル	50 μl

サーマルサイクラーの温度プロファイル:

	温度	時間	サイクル数
最初の変性	95°C	2分	
変性	94°C	10秒	40x
アニーリング	60°C	30秒	
伸長	72°C	2分	
最終の伸長	72°C	7分	

作成したプローブはスピンカラムで精製し、10 μLづつマイクロチューブに分注して、-20°Cで保存した。

2)ブロットの作成

①市販DNA抽出キットを用いて結核菌から抽出したDNAを*Pvu* IIで切断後, DIG標識DNAサイズマーカーIIIと共に0.8%アガロースで電気泳動分離

②アルカリ変性溶液(0.5N NaOH, 1.5M NaCl)でゲルを室温、15分×2回処理

③蒸留水で洗浄

④中和溶液(0.5M Tris-HCl, 3M NaCl pH7.5)でゲルを室温、15分×2回処理

⑤3時間~O/Nのキャピラリー・トランスファー(20×SSC, GIBCO BRL)でニトロセルロースメンブレンへ転写

⑥UV固定(120mJ)

⑦蒸留水で洗浄

3）ハイブリダイゼーション

①DIG Easy Hyb（30mL/100cm²）を使用してDNAオーブン内で42℃、30分のプレハイブリダイゼーション
②ハイブリダイゼーション溶液（DIG Easy Hyb 30mL＋変性したプローブ 10μL）を使用してDNAオーブンで42℃、O/Nのハイブリダイゼーション
［再利用する場合は、ハイブリダイゼーション溶液を回収し、日付とプローブ名を明記し－20℃保存した。］

③2×洗浄液（2×SSC, 0.1%SDS）で振盪しながら室温で洗浄（5分×2回）
④0.1×洗浄液（0.1×SSC, 0.1%SDS）で振盪しながら42℃で洗浄（5分×2回）

4）DIG化学発光検出

検出系で必要となる各種バッファーの調製にはDIG洗浄＆ブロックバッファーセットを利用した。①～⑤の各ステップは、室温で振とうしながら行った。
①1×洗浄バッファーで1分リンス
②1×ブロッキング溶液（30mL）で30分インキュベート
③希釈抗体溶液（1×ブロッキング溶液30mL＋AP標識抗DIG抗体1.5μL）中で30分インキュベート
④1×洗浄バッファー（100mL）で15分、2回洗浄
⑤1×検出バッファー（30mL）中で2分平衡化
⑥CPD-Star, ready-to-use（0.5mL/100cm²）をメンブレンへアプライ
⑦メンブレンの入ったハイブリダイゼーションバックをシール
⑧ルミ・イメージャー（Luminescenceモード）で10分露光

結果と考察

図1に示したように、Lane 1～Lane 4の検体が同一のパターンを示し、保健所の調査を裏付ける結果となりました。結核菌の疫学マーカーとしてIS6110をプローブとしたRFLPの有効性については、多くの報告により実証されていますが、その手技は煩雑です。当所のように行政に属する研究機関では、転勤による人の入れ替わりが常に考えられ、一定以上のクオリティを得ることと、突然の依頼に対して、他の業務への影響を最小限とするために、コストは高くなるものの、市販キット等の導入が有効であったと思われます。

◆参考文献

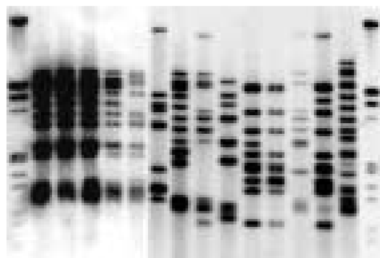
1）Van Embden J.D.A., Cave M.D., Crawford J.T. *et al.*（1993）Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J.Clin.Microbiol., 31, 406-409

2）高橋光良（1998）RFLP分析を用いた結核菌の分子疫学，日本細菌学雑誌，53，662-668

3）DIGシステムを用いてハイブリダイゼーションを行うためのユーザーガイド第2版，Roche Diagnostics GmbH

4）Tabet S.R, Goldbaum G.M, Hooton T.M *et al*（1993）Restriction fragment polymorphism analysis detecting a community based tuberculosis out break among persons infected with human immunodeficiency virus, J. Infect. Dis., 169, 189-192
5）Takahashi M., Kazumi Y., Fukuzawa Y. *et al*（1993）Restriction fragment length polymorphism analysis of epidemiologically related *Mycobacterium tuberculosis* isolates, Microbio. Immunol., 37, 289-294

（今回、三重県科学技術振興センター 保健環境研究部 微生物研究グループの岩出 義人先生のご厚意によりご提供頂きました。）



M：DIG標識DNAサイズマーカーIII
Lane 1～4：検体，Lane 5～14：対照

図1. *M.tuberculosis*のRFLP解析

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
PCR DIG Probe Synthesis Kit	1 636 090	1キット（25回標識分）	￥64,800
DIG標識DNA MWM III	1 218 603	5μg（500μl）	￥26,000
DIG Easy Hyb	1 603 558	500ml	￥27,200
DIG Wash & Block Buffer Set	1 585 762	1セット（30ブロット分）	￥26,500
Anti-DIG-AP, Fab fragment	1 093 274	150U（200μl）	￥18,800
CDP-Star, ready-to-use	2 041 677	2x50ml	￥33,900
Lumi-Imager F1 Work Station	2 012 847	1台	ご照会

インター ネット

Find Out What's new!

Tips & Facts

ファストスタートDNAポリメラーゼ
ーレーザーキャプチャーマイクロダイセクション試料を用いたRT-PCRに最適

はじめに

レーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)は、固定組織切片から少量の細胞や細胞サブポピュレーションの分離を可能とする新しい技術です。そのダウンストリームアプリケーションには、高感度な技術であるRT-PCRを用いた遺伝子発現研究が含まれます。しかし、少量の開始材料を使用する時、遺伝子の増幅において、高い特異性と感度を得ることが重要です。それゆえ私たちは、LCMにより分離された少量の細胞における、発現実験の定量化での至適な組み合わせを決定するために、市販のリバーストランスクリプターゼとホットスタートTaq DNAポリメラーゼの比較実験を行うことにしました。

材料と方法

70%エタノールで固定された子宮の8μm 凍結切片から、PixCell レーザーキャプチャーマイクロダイセクションシステム(Arcturus Engineering)を使用して、マウス管腔内皮細胞ポピュレーションを分離した。サンプル当たり100回のレーザーショット(15μm)の平均を使用し、100−200細胞を得た。トータルRNAは市販のキットを使用して抽出し、3等分した。

cDNAは、ランダムヘキサマーと3社からのリバーストランスクリプターゼを使用して、20μlのトータル容量中で合成した。グリセロアルデヒド-6-リン酸脱水素酵素(GAPDH)の発現を、1μlのcDNAのPCRにより測定した。

GAPDHは20μlのトータル容量で、5種類の異なるホットスタートTaq DNAポリメラーゼ(サプライヤー1, 2, 3, 4, ファストスタートDNAポリメラーゼ)を使用して増幅した。各反応液は各社供給のPCRバッファーと各0.2μMのプライマー、200μMのdNTPを含んでいる。ファストスタートDNAポリメラーゼ(0.8 U)は、2 mM $MgCl_2$の終濃度で使用した。PCRは95℃で4分間の変性/活性化ステップで開始し、PCRサイクルは95℃、30秒で開始し、60℃のアニーリング温度、72℃で45秒の伸長温度を続けた。これを40サイクル繰返し、72℃で7分間の最終伸長であった。同様のサイクル条件を他のホットスタートTaq DNAポリメラーゼでも使用した。結果としての300 bpのPCR産物を2%のアガロースゲルで電気泳動し、SYBR green染色をUV光で可視化した。

結果と討論

数種のリバーストランスクリプターゼと、ホットスタートTaq DNAポリメラーゼの効率を比較するために、マウス子宮の管腔内皮LCMサンプルからトータルRNAを抽出しました。cDNA合成は、3種類のリバーストランスクリプターゼを使用して行われ、GAPDHはファストスタートTaq DNAポリメラーゼを含む、5種類のホットスタートTaq DNAポリメラーゼにより増幅されました。

GAPDH cDNAはそれぞれのケースで増幅されましたが、リバーストランスクリプターゼとホットスタートTaq DNAポリメラーゼ両者を比較した時、効率と特異性に変動がありました(図1)。ファストスタートTaq DNAポリメラーゼによるGAPDHの増幅率は、一般的に、他のサプライアーのホットスタートDNAポリメラーゼに比べ良好でした。しかし、他のホットスタートTaq DNAポリメラーゼでは多く見られる非特異的増幅が、ファストスタートTaq DNAポリメラーゼでは最少でした。それゆえ、ファストスタートTaq DNAポリメラーゼが、LCM試料から抽出されたRNAの至適なPCR増幅に選ばれました。

ファストスタートTaq DNAポリメラーゼは、LCM試料中のエストロゲンレセプターαとβ等の、GAPDHより希少なターゲットの増幅にも成功しています。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
ファストスタート Taq DNAポリメラーゼ	2 158 264	50 units (25回PCR反応)	\ 7,200
	2 032 902	100 units (50回PCR反応)	\ 11,700
	2 032 929	2 x 250 units (250回PCR反応)	\ 51,500
	2 032 937	4 x 250 units (500回PCR反応)	\100,900
	2 032 945	10 x 250 units (1250回PCR反応)	\213,700
	2 032 953	20 x 250 units (2500回PCR反応)	\386,200

詳細はインターネットで!!→
http://biochem.roche.com/pcr

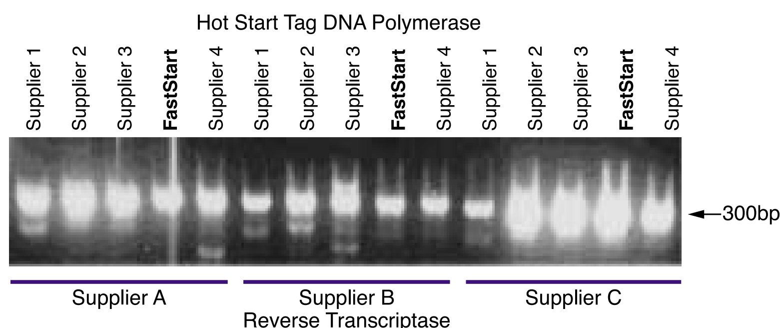


図1：レーザーキャプチャーマイクロダイセクションで分離した、マウス子宮の管腔内皮細胞の40サイクル以上での、GAPDHのRT-PCRにおける、リバーストランスクリプターゼとファストスタートTaq DNAポリメラーゼの効率の比較。

Geno Pure プラスミドキット
ーRTSでの*in vitro*タンパク質発現のための
プラスミドDNA精製キット

はじめに

ラピッドトランスレーションシステム（RTS）は、T7ポリメラーゼと*E. coli* ライセートに基づく、高収量な*in vitro*タンパク質発現システムです。中、小スケールフォーマットでの発現は前核細胞タンパク質発現に至適化されたプラスミドDNAを用いて達成されます。RTSタンパク質発現反応において高純度のプラスミドが要求されるため、通常、プラスミドは陰イオン交換クロマトグラフィーにより調製されます。新しいGeno Pure DNAミディおよびマキシキットで分離されたDNAがRTSでの発現に試験されました。

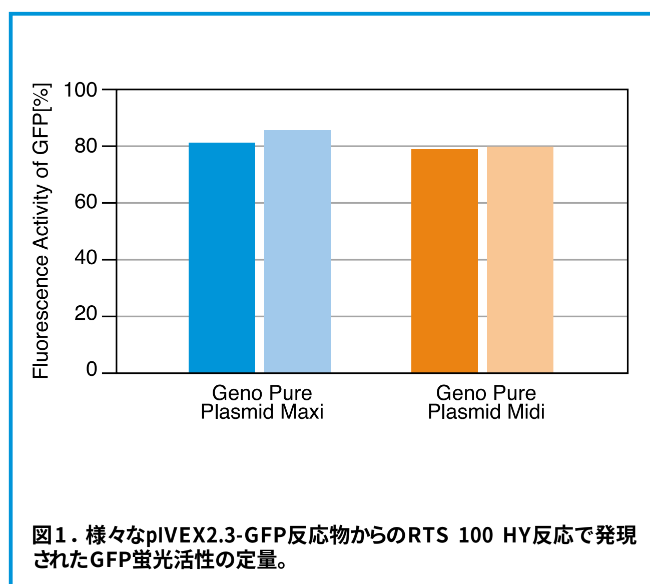


図1．様々なpIVEX2.3-GFP反応物からのRTS 100 HY反応で発現されたGFP蛍光活性の定量。

材料と方法

グリーンフルオレッセントタンパク質（GFP）遺伝子をコードするプラスミドpIVEX2.3-GFPが、*E. coli* XL1ブルーから使用説明書通りに単離された。セルフリー発現実験は、RTS 500 HYとRTS 100 HYキットの説明書に従い行った。7.5 μgのプラスミドをRTS 500 HY、0.5 μgをRTS 100 HYでの、テンプレートとして使用した。

結果と討論

GFPとC-末端のHis$_6$タグをコードするpIVEX構築物からのプラスミドDNA（pIVEX2.3-GFP）を、Geno Pureプラスミドミディとマキシキットで調製した。この2種類のキットを用いての調製品は、高い純度と高収量のDNAという結果をもたらした。様々なDNAサンプルの中スケール（RTS 500 HY）および小スケール（RTS 100 HY）への適合性は、以下のように分析された。RTS 100 HYシステムでのGFPの*in vitro*合成後、蛍光強度が測定された（図1）。同様の結果がRTS 500反応でも得られた。DNAサンプルから作成された合成GFPの品質はウェスタンブロットで分析された（図2）。図が示すように、Geno Pureプラスミドキットで調製されたDNAは、RTS 100からRTS 500へのスケールアップ反応に適していた。それゆえ、RTS 500 HYからRTS 9000 HYへの、そのままのスケールアップが期待される。新しいGeno Pureプラスミドマキシおよびミディキットは、このアプリケーションの厳しい要求に合致し、ラピッドトランスレーションシステムでのテンプレートとして使用される、プラスミドDNAの分離に強く推奨される。

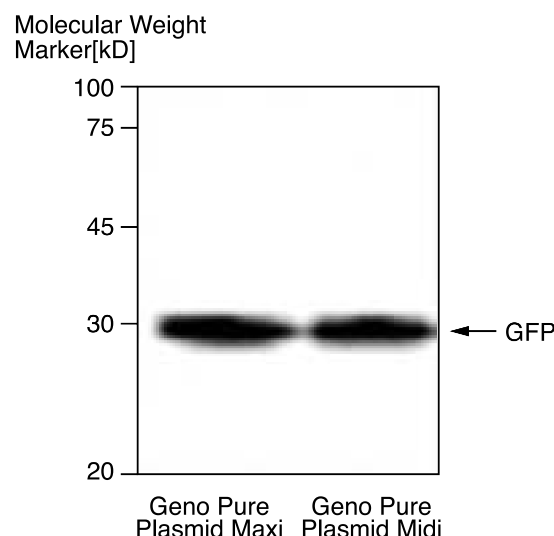


図2．RTS 500 HY反応で発現後のGFPのウェスタンブロット分析。
等容量の希釈反応液をSDS-PAGEで分離し、ブロットした。検出は、POD標識抗His$_6$抗体で行った。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
Geno Pureプラスミドミディキット	3 143 414	1キット（20回調製）	\ 17,000
Geno Pureプラスミドマキシキット	3 143 422	1キット（10回調製）	\ 18,000
RTS 100 *E. coli* HYキット	3 186 148	1キット（24回反応）	\ 58,000
	3 186 156	1キット（96回反応）	\158,000

インター ネット
Find Out What's new!

ジーンエキスプレッションアレイ：ターゲット増幅のための改良されたツールによる発現パターンの高感度検出

はじめに

ヒトゲノムシークェンスプロジェクトが完了した今、マイクロアレイテクノロジーは、ゲノムの複雑性の研究に、優れた力を提供します。この技術は、生物の全ての、あるいは関連のサブセットを測定することにより、核酸から機能的な情報を直接に引き出す能力があります。

トータルRNAの分離後、様々な方法がマイクロアレイスクリーニングのためのターゲット調製にアプライされます（図1）。最も一般的な操作法は、蛍光標識核酸を取込ませる逆転写による直接cDNAラベリングです。この技術の最大の欠点は、ハイブリダイゼーション毎に大量のRNAが必要となることです。医学研究におけるもっとも重要なアプリケーションのいくつかは、ごく少量の組織（マイクロダイセクション組織[LCM]や腫瘍からの生検サンプル）で研究されます。それゆえ、様々なターゲットの増幅法がこの制限を克服するために開発されてきました：

→直鎖cRNA増幅法。T7プロモーターと結合するOligo dTプライマーによる逆転写と、DNAのT7 RNAポリメラーゼによる*in vitro*トランスクリプションに基づき、RNAターゲットを約100倍に増幅する。この方法はRNAポピュレーション内の、個々のmRNAシークェンスの相対量を大きくねじまげない。

→PCR増幅法。逆転写と、それに続くcDNAのランダムPCR増幅とPCR産物のT7 RNAポリメラーゼによる*in vitro*トランスクリプションに基づく（図2）。この方法では発現プロファイリングに、50 ngのRNA（1000個の細胞あるいは0.1 mgの組織由来）しか必要としない。

これらの増幅方法の偏向を調べるため、スプライシングの変動の少ない酵母をモデル真核生物として使用しました。実験はリッチおよび最少培地で生育した2種類の細胞ポピュレーションで行いました。

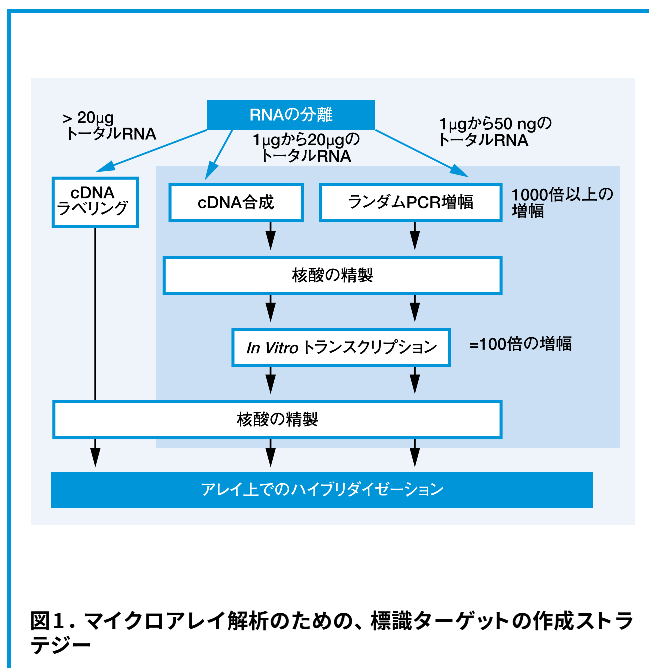


図1．マイクロアレイ解析のための、標識ターゲットの作成ストラテジー

材料と方法

サンプル材料

*Saccharomyces cerevisiae*はYPD培地（50 g/l、リッチ）とSD基礎培地（26.7 g/l、最少）で生育させた。2%のD-グルコース（炭素源）を両方の培地に加えた。細胞は1：4希釈でODが0.4になるまで生育し、40 mlの細胞懸濁液から採取した。トータルRNAの分離を行った。

ターゲットの調製／増幅

ダイレクトcDNAラベリングはMWG PAN YEASTアプリケーションガイドに従い行った。100 μgのトータルRNAをM-MuLVリバーストランスクリプターゼとCy3-およびCy5-dCTP（Amersham Bioscience）を使用して40 μlの標識反応液中でラベルした。直鎖増幅は10 μgの酵母トータルRNAを開始材料とし、標識にCy3-とCy5-UTPを用い、cDNA合成システム、マイクロアレイターゲット精製キット、マイクロアレイRNAターゲット合成キット（T7）の説明書に従い行った。ランダムPCRラベリングは50 ngの酵母トータルRNAにより、標識にCy3-とCy5-UTPを用い、マイクロアレイターゲット増幅キット、マイクロアレイターゲット精製キット、マイクロアレイRNAターゲット合成キット（T7）の説明書に従い行った。

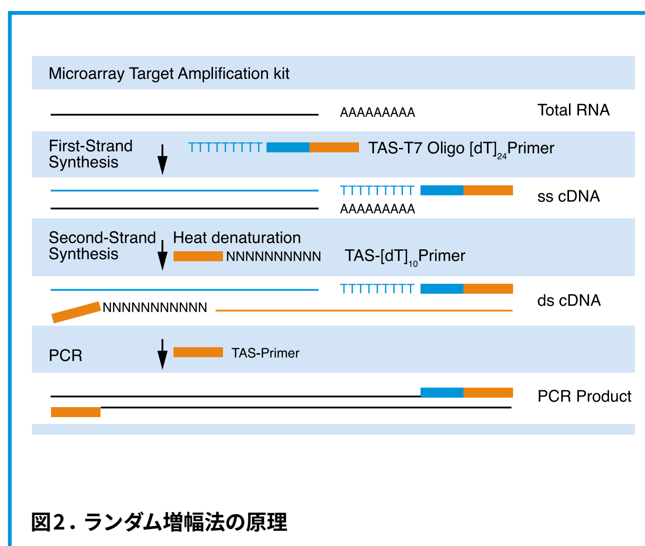


図2．ランダム増幅法の原理

ハイブリダイゼーション

相当する酵母ポピュレーションの、1 μ gのCy3-およびCy5-標識cDNA、あるいは10 μ gのcRNAをハイブリダイゼーションに使用した。ハイブリダイゼーションは50% フォルムアミドを含むバッファーを使用して42℃で、オーバーナイトで行われた。

酵母のマイクロアレイ

コンタクトプリンティング原理を使用し、40 bpの5'-修飾オリゴヌクレオチドを固層表面に共有的に結合した。各アレイは酵母の様々なオープンリーディングフレームを検出するための6,250個のオリゴヌクレオチドより構成された。

イメージ解析

シグナル強度のスキャンは共焦点レーザースキャン顕微鏡で行った。各スライドはダイナミックレンジを拡張するための光電管のインクリージングセッティングで、チャンネル毎に6回、スキャンされた。結果イメージはImagene 4.0ソフトウェアで分析され、出力ファイルはMWG NAVIソフトウェアを使用してのトータルシグナル強度とロ

ーカルバックグランドの差し引きにより両チャンネル間で補正された。

ライトサイクラーでのRT-PCR

定量RT-PCRはDNAハイブリダイゼーションプローブフォーマットを用いて、ライトサイクラー上で行われた。cDNAは、20μgのトータルRNAと決定された数のネオマイシンmRNA（スパイクによるコントロール）、オリゴdTプライマー、AMVリバーストランスクリプターゼを含む20μlの反応液中で、トータル酵母RNAから作成された。RNAとプライマーは最初に70℃で10分間変性され、42℃で60分間インキュベートされ、最後に94℃で5分間変性された。200 pgと20 pgのcDNA、プライマー、ハイブリダイゼーションプローブ、ライトサイクラー ファストスタートDNAマスターが20μlの反応液中で使用された。反応条件は：95℃で10分間の変性、95℃で10秒間、55℃で15秒間、72℃で15秒間を45サイクル。蛍光は各55℃でのインキュベーションの最後にモニターされた。チャンネルF2/F1で検出された蛍光は、ライトサイクラー解析ソフトウェアで分析された。各反応のクロッシングポイントが、セカンドデリバティブマキシマムアルゴリズムとアリスメティックベースラインアジャストメントを使用して測定された。定量化のために、ネオマイシンmRNAの希釈系列カーブを使用した。

結果と討論

増幅の有無で得られた結果の補正

リッチおよび最少培地で生育した*Saccharomyces cerevisiae*のトータルRNAを3種類の方法でCy3とCy5を標識しました（図1）：

→逆転写による100μgのトータルRNA（cDNAラベリング／増幅無し）

→直鎖増幅による10μgのトータルRNA（cDNA合成とその後の*in vitro*トランスクリプション）

→ランダム増幅による50 ngのトータルRNA（ランダムPCR増幅とその後の*in vitro*トランスクリプション）

プローブ各セットのための、2種類のハイブリダイゼーションは、補正とハイブリダイゼーション人工物を最小限にするためにダイスワップをし、MWG PAN YEASTアレイ上で行われました。

低強度シグナルの閾値は、15個の*Arabidopsis* 特異的ネガティブコントロールスポットの平均シグナル強度を基にして計算しました。これら15スポットの平均値に標準偏差を足し、それを1.96倍し、この価を越えた数値を信頼性95%の特異的ハイブリダイゼーションとしました。

6,250スポットの内で、75%（4,690）が閾値以上のシグナル強度を示しました。これらの酵母ORFのために、リッチおよび最少培地で生育した酵母から得られたハイブリダイゼーションシグナルの平均率を測定しました。4,690の酵母ORFの内、ダイレクト標識法で、562個のORFが2倍以上、496個のORFが0.5以下の比を示しました。これらの発現率は各ターゲット標識法において、高い再現性がありました。これは表1のcDNAラベリング法で示されます。多く（97%）の遺伝子において、平均発現率は2倍以下の変動を示しています。同様の結果が直鎖増幅とランダム増幅での比較により得ることができます（データ不掲載）。

最も重要な質問は、この3種類の方法が同様の発現の差異を示すことができるかどうかです。それゆえ、我々は増幅法によるcDNAラベリング法を比較しました。表1は、酵母遺伝子の92%が、cDNAラベリング法と直鎖増幅法を比較した時に、比較可能な発現挙動（2倍以下の変動）を見せることを示しています。cDNAラベリングをランダムPCR増幅と比較した時、酵母遺伝子の89%が同様の挙動を見せます。これらの結果は、異なる方法は各テンプレートから同数の標識ターゲット分子を作成するわけではないことを示唆しています。むろん、方法内の増幅程度はある反応から他の反応で再現性があります。また、異なる方法は同様の発現挙動をもたらします。

表1：PAN YEASTアレイ上の増幅および非増幅ターゲット間の発現挙動の補正（リッチ対最少培地）

変動係数	cDNA/cDNA（増幅無し）	cDNA/直鎖増幅	cDNA/ランダム増幅
≦｜1.3｜	3701（66%）	2805（60%）	2423（52%）
≦｜1.6｜	4336（92%）	3829（76%）	3580（76%）
≦｜2｜	4549（97%）	4292（92%）	4164（89%）
＜｜2｜	141（3%）	398（8%）	526（11%）

ライトサイクラーでの定量PCRによる結果の評価

どのターゲット調製法が生物的状況を最適に反映しているかを見つけるため、他の独立した方法（定量RT-PCR）を、数種類の遺伝子に適用しました。リッチおよび最少培地中のアップレギュレートグループから2種類、ダウンレギュレートグループから2種類をランダムに選択しました、さらに、挙動の変化を示さない3種類のハウスキーピング遺伝子と、異なる方法で違う発現挙動を示したグループから4種類の遺伝子を選択しました。アップおよびダウンレギュレートグループとハウスキーピング遺伝子は同じ比率を示しました（図3）。yol 086cとyjl 153c ORFsは、cDNAラベリングとライトサイクラー定量がより広いダイナミックレンジを持っていることを示しています。

それらの発現レベルにおける遺伝子の変動は、使用したターゲット調製法に依存していることを（図3D）、ライトサイクラーによる分析で確認しました。驚くべきことに、cDNAラベリング法を使用した時にはyor 091wはダウンレギュレートされたように見えましたが、他の方法ではアップレギュレートされています。cDNAラベリング法はより変動バイアスが少ないと考えられるため、これは期待されないことでした。それにもかかわらず、この結果は独立した実験（図3E）で確認されました。使用した方法による、個々のmRNAの相対量における潜在的歪曲の他に、増幅および非増幅ターゲット間の差異も、異なる構造（RNA対DNA）や長さが原因しています。cDNA

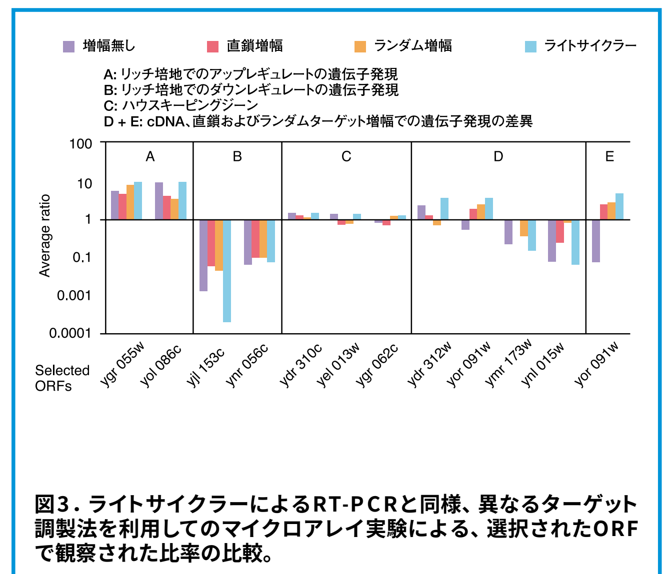


図3．ライトサイクラーによるRT-PCRと同様、異なるターゲット調製法を利用してのマイクロアレイ実験による、選択されたORFで観察された比率の比較。

インターネット

Find Out What's new!

のダイレクト標識により作成されたターゲットは、400 bpから数kbまでの長さに渡ります。増幅ターゲット(cRNA)はハイブリダイゼーションの前に断片化が必要とされます。それゆえ、これらの断片は50 bpから数100 bpに渡ります。1 μgの標識cDNAがアレイにアプライできるにもかかわらず、10 μgのcRNAが十分な強度のために必要でした。ターゲットの長さや構造(RNA対DNA),濃度における差異が、ハイブリダイゼーションパターンの変動と同様に、ハイブリダイゼーション間の様々なターゲットにおける二次構造の形成に基づく変動を導きます。

結論

マイクロアレイによる様々な生物や細胞のタイプよりの発現プロフィールの解析は、今や多くの研究室で実施されています。開始材料の量の変動に基づき、cDNAラベリング、直鎖増幅、PCRベース増幅法は、矛盾の無い比較可能なデータを保証することが示されました。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
cDNA合成システム	1 117 831	1キット(10回反応)	\ 68,900
マイクロアレイ ターゲット合成キット(T7)	3 266 877	1キット(25回反応)	\ 32,000
マイクロアレイ ターゲット増幅キット	3 310 191	1キット(10回反応)	\135,000
マイクロアレイ ターゲット精製キット	3 266 885	1キット(50回反応)	\ 33,000

TUNEL：*In Situ* アポトーシス細胞の同定法の改良と評価

TUNELキット好評につき、1997年第2号の記事を改校、再掲載したものです。

はじめに

TUNEL法は、培養細胞調製品のアポトーシス細胞フラクションを迅速に同定、定量する際に、まず選択される方法として知られています。この方法が形態学的検出より好まれる理由としては、以下の2点が主なものです。

1)過程が速い:クロマチンの凝集と細胞の断片化に2-5分、アポトーシス体の大食に3時間。

2)アポトーシス細胞の"形態"は広範囲にわたり、いくつかのニュアンスがある:アポトーシスの核は切断することなく凝集する。アポトーシスの初期では、核は、DNAが断片化を開始する間に伸長される。それ以上に核の形態は試料の固定法に強く依存する。

DNA断片への酵素の近接性は、DNAを取り囲んでいる核タンパク質により減少し、アルデヒド、パラホルムアルデヒド、フルムアルデヒドによる固定化やエタノールによるポスト固定化により損なわれます。

TUNELの感度と特異性を改良するために、各種の固定法と前処理法を検討し、至適なTUNELプロトコールを考案しました。

材料と方法

固定化	―6種類の固定液(パラフォルムアルデヒド、フォルマリン、B5、メタノール、BOUIN、アセトン)を検討。
前処理法	―界面活性剤(0.1% Triton X-100、氷上2分間)、プロテアーゼ(プロティナーゼK)、マイクロウェーブ照射とその後の急冷を検討。
TUNEL法	―3種類の変法(このラボ独自のプロトコール、ロシュ・ダイアグノスティックスの*In Situ* Cell Death Detection Kit, POD、他社の*In Situ* cell detection kit)。

結果と考察

TUNELプロトコール:3種類のTUNELプロトコールにおいて、感度と特異性については顕著な差は見られませんでした。しかし、ロシュ・ダイアグノスティックスのキットで最も高いパーセントのTUNEL陽性アポトーシス細胞が得られ、最高のシグナル/バックグランド比が得られました。また操作も一番簡単でした。

固定:固定の方法に関わらず形態学的な同定は可能です。しかし、クロマチンの外観には大きな差異があり、Bouin液固定では最適、メタノール固定では不良でした(図1参照)。

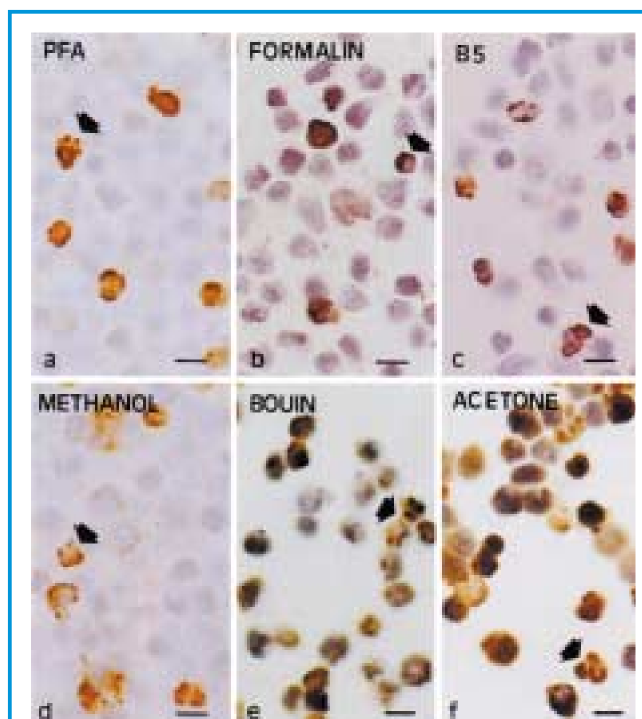


図1．TUNELにおける固定液の効果。
CEM-C7細胞を以下の固定液で処理した。A) 4% パラフォルムアルデヒド;B) 4% フォルムアルデヒド;C) B5;D) メタノール;E) Bouin液;F) アセトン。電子線照射を使用し、TUNELはロシュ・ダイアグノスティックスのキットで行った。倍率:x 132. バーの長さは5 μm。典型的なアポトーシスの形態を表す細胞は矢印で示している。

インター ネット
Find Out What's new!

前処理：前処理無しでは、5種類の固定液ではアポトーシスの形態を持つ細胞の20%以下しかラベルされず、アセトン固定でも55%でした。

感度：もっとも感度を上げたのはマイクロウェーブ照射（370 W、5分）で、2-30倍向上し、すべての固定液で90%以上のアポトーシス細胞がラベルされました。界面活性剤は効果があまりありませんでした。プロティナーゼK処理は、感度を改善しましたがマイクロウェーブ照射の1/2でした。

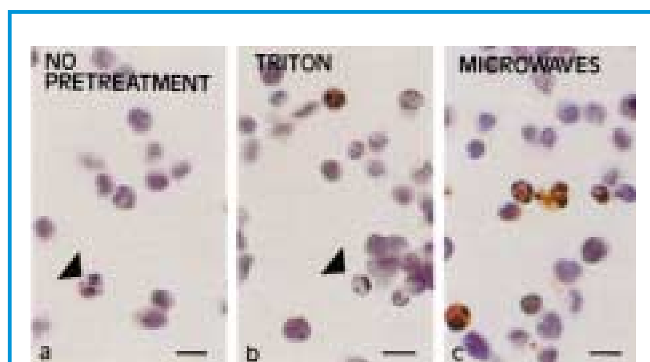


図2. TUNELにおける前処理の効果。
細胞はBouin液で固定され、ロシュ・ダイアグノスティックスのキットでTUNELを行った。倍率：x 132. バーの長さは5 μm。(A) TUNELの感度は固定法に関わらず、前処理無しでは不十分であった。アポトーシスの形態を持つほとんどのCEM-C7細胞が標識されていない事に注意（矢印）。(B) 界面活性剤（Triton）はわずかに感度を改善したが、まだ多くのアポトーシス細胞が未標識のままである（矢印）。(c) 形態を指標とし、マイクロウェーブでの前処理がベストな条件であった。

特異性：メタノールとアセトン固定の試料以外は、前処理により特異性が失われる事はありませんでした。プロティナーゼ K処理はメタノール、アセトン固定で、正常細胞核のラベルを劇的に増加させました。しかし、マイクロウェーブ照射が一番効果的でした。

結論

アポトーシスの比較可能な定量化は、サンプルの固定と前処理の標準化を前提とします。標識は、一般的なバックグランドと比較して強く、生細胞やネクローシス細胞の特徴を欠いた細胞に局在する時のみ、特異的であると受容すべきです。

→詳細は、BIOCHEMICA 97 No.2 (www.roche-applied-science.com) で！

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
In Situ Cell Death Detection Kit, POD	1 684 817	1 kit (50テスト)	￥66,200
TUNEL Label	1 767 291	3 x 50 μl (30 テスト)	￥16,800
Proteinase K	1 413 783	5 ml	￥ 8,300
	1 373 196	25 ml	￥21,500
	1 373 200	1.25 ml	￥64,700
Triton X-100	1 332 481	5 x 10 ml	￥10,300
	789 704	100 ml	￥ 3,200

ライトサイクラー & MagNA Pure コーナー

ゲノム薬理学研究：ヒトチトクロームP450 2C9および2C19遺伝子の主要SNPsのジェノタイピング用ライトサイクラーキット

チトクロームp450（CYP）ファミリーのメンバーは、内在性の物質、栄養原、環境毒物などの代謝に関与しています。チトクロームp450は一般的に使用される薬剤の代謝への関連が知られています。CYPファミリーの各メンバーは好みの基質セットを持っています：CYP2C9はワーファリン、トルブタミド、フェニトイン、ロサルチンなどの複数の基質を代謝します。CYP2C19で代謝されると記述された基質としては、ジアゼパン、オメプラゾール、プロプラノロールなどがあります。2つの良く知られる対立遺伝子多型（CYP2C9ではCYP2C9*2 [C430T]とCYP2C9*3 [A1075C]、CYP2C19ではCYP2C19*2 [G681A]とCYP2C19*3 [G636A]）は、1塩基置換により野生型から派生しました。文献は、これら対立遺伝子多型は相当する基質に関する酵素活性の低下に関連することを示唆しています。

製品の記述

ライトサイクラー—CYP2C9とCYP2C19ミューテーションデテクションキットは、ヒトCYP2C9とCYP2C19遺伝子の2種類の主要な1塩基置換（SNPs）を同時に検出できます。これは、各キット内のミューテーションデテクションミックスによるデュアルカラー実験とメルティングカーブ分析により実行されます。各ミューテーションデテクションミックスは、1塩基置換を検出できる配列特異的LC-Red 640標識ハイブリダイゼーションプローブ（すなわち、それぞれC430T[CYP2C9*2]やG636A[CYP2C19*3]）を含みます。ミックスはまた他の1塩基置換を検出できる配列特異的LC-Red 7050標識ハイブリダイゼーションプローブ（例すなわち、それぞれA430C[CYP2C9*3]やG681A[CYP2C19*2]）を含みます。

特徴と利点

簡単な取り扱い
→キットには必要な成分がすべてレディー-ツー-ユースミックスで含まれます。
→全ての試薬は機能試験済みで、簡便なレディー-ツー-ユース溶液として供給され、更なる至適化の必要無く使用できます。
利点：専門的な知識は必要としません。

迅速で、操作数が少ない
→増幅とジェノタイピングはライトサイクラー上での組み合せ法で行われます。
→2つの主要な1塩基置換多型の同時ジェノタイピングが、ライトサイクラーのメルティングカーブ分析を使用して32サンプルを60分以内に可能。
利点：時間の節約／労働コストの削減

信頼性のある性能／標準化されたキットというコンセプト
→プライマーとハイブリダイゼーションプローブは配列特異的です。
→ファストスタートTaq DNAポリメラーゼを最大の特異性と感度を得るために、" ホットスタート "成分として使用しています。
→キットはポジティブコントロールテンプレートとして、ヘテロザイガスなプラスミドDNAを含んでいます。
利点：結果は明瞭で、個々のサンプルやラン間で比較可能です。

New Web Site

インターネット

Find Out What's new!

以前に保存しておいたカラーコンペンゼーションファイルの使用が、これらのデュアルカラー遺伝子型実験の分析に、まず必要となります。(1本のキャピラリー中でLC-Red 640とLC-Red 705-標識ハイブリダイゼーションプローブを使用した時チャンネル間で観察される)クロストークを除去するカラーコンペンゼーションファイルの作成は、ライトサイクラー―カラーコンペンゼーションセットで行えます。これらのキットは、薬剤や毒物の代謝におけるCYP2C9およびCYP2C19遺伝子の関連性を理解するための研究ツールとして意図されています。

Order INFO

製品名	製品番号	包装単位	希望価格
ライトサイクラー―CYP2C9 ミューテーションデテクションキット	3 266 982	1キット (最大30サンプル)	\45,000
ライトサイクラー―CYP2C19 ミューテーションデテクションキット	3 267 008	1キット (最大30サンプル)	近日発売
ライトサイクラー―カラー コンペンゼーションセット	2 158 850	1セット (5キャリブレーション)	\16,400

New Web Site

ロシュ・ダイアグノスティックス、オンラインカタログ(日本語版)

機器の充実や、2000/2001年研究試薬・機器カタログの発刊の後、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社では試薬・機器カタログのオンライン化を進めてまいりました。今回、2000年、2001年の新製品を加え、ウェブ版日本語カタログが完成しましたので、ぜひご覧ください。



[特徴]

☆検索ボタンをクリックしてください。製品検索画面が現れます。製品番号、製品名の一部、テクノロジーで検索することができます。

☆オンラインカタログから直ちに使用説明書/MSDSが入手可能です(日本語版のある物は日本語版も入手可能です)。

☆ユーザー登録するとショッピングカート・お気に入りの機能が使用できます。ショッピングカートへ製品を入れると、製品番号、製品名、個数、合計金額も記録され、代理店へのFAXオーダーシートとして使用できます(将来的には弊社への直接注文機能を附加)。

☆ユーザー IDとログオンパスワードは、御自身で自由に設定できます。

☆ストリーミングサーバとの連動で、ライトサイクラー、マグナピュア等のインスツルメントのオンラインデモンストレーションがご覧になれます。

オンラインカタログのURL →
http://www.ibuybiochem.jp/

ただいま下記のキャンペーンを実施中です。
詳細はインターネットで !!

☆ アポトーシス研究用キット 30% OFF
2002年5月−6月末日まで

0205B28

Roche

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
〒105-0014　東京都港区芝 2-6-1　日本ロシュビル
バイオケミカルビジネス本部
TEL. 03-5443-5287　FAX. 03-5443-7098
日本版ホームページ：http://www.rochediagnostics.jp
(e-mail：tokyo.biochemicals@roche.com)
インターナショナルホームページ：http://roche-applied-science.com

札幌支店 TEL.011-251-1331 FAX.011-231-1603
仙台支店 TEL.022-224-6491 FAX.022-267-3877
名古屋支店 TEL.052-220-5741 FAX.052-220-5742
大阪支店 TEL.06-4863-7621 FAX.06-4863-7625
広島支店 TEL.082-223-6151 FAX.082-223-8069
福岡支店 TEL.092-461-1021 FAX.092-461-1025